

DESENVOLVIMENTO DE HIDROLISADOS DE LEVEDURA UTILIZANDO DIFERENTES ENZIMAS

LEANDRO G. LINS¹; MARIA T.B. PACHECO²; APARECIDA S. SOUZA³; VERA S.N. SILVA³; ELIANA S. KAMIMURA⁴

Nº 10227

RESUMO

O estudo teve como objetivo avaliar as melhores condições para obter hidrolisados protéicos de levedura, utilizando diferentes enzimas exógenas. Para tanto foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como matéria prima. As hidrólises foram feitas a partir de um planejamento experimental 2², com 11 ensaios, sendo 3 pontos centrais utilizando 3 enzimas distintas: Alcalase, Viscozyme e Protex 51FP. A otimização das hidrólises enzimáticas foi realizada através da metodologia de Superfície de Resposta, de modo a obter maiores valores de grau de hidrólise e de recuperação de proteína. Após serem feitas as hidrólises os ensaios foram submetidos à determinação de grau de hidrólise (%GH) por TNBS (Trinitrobenzenosulfônico) e ao rendimento da recuperação de proteína. As respostas das curvas de contorno mostraram que a hidrólise feita com a enzima Alcalase apresentou o maior %GH e rendimento da recuperação da proteína nas condições de pH 8,0 e concentração da enzima de 2,0 % (p/p). Para a enzima Viscozyme a melhor atividade hidrolítica foi obtida com pH 4,4 e concentração da enzima na faixa de 2,0% (p/p). A enzima Protex 51FP apresentou melhor desempenho em pH 8,0 e concentração da enzima de 2,0% (p/p). O grau de hidrólise e recuperação da proteína foi de: 45,05% e 63,95; 26,81% e 52,87%; 74,8% e 89,48%, para as enzimas alcalase, viscozyme e protex 51FP, respectivamente. Mesmo após 8 horas de hidrólise a reação de quebra continuou ocorrendo com todas as enzimas devendo ter ocorrido uma ação complementar das enzimas endógenas que foram liberadas das células depois do rompimento da parede celular.

Palavras chaves: Hidrolisados de levedura, hidrólise enzimática, levedura

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Nutrição, UNIP, Campinas-SP, ✉ lglins@gmail.com

² Orientador: Pesquisador, CCQA/ITAL, Campinas-SP.

³ Colaborador: Pesquisador, CCQA/ITAL, Campinas-SP.

⁴ Colaborador: Professor, FZEA/USP, Pirassununga -SP.

ABSTRACT

The study aimed to determine the best conditions to obtain protein hydrolysates of yeast, using different exogenous enzymes. For this we used the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as raw material. The hydrolysis was made from an experimental design 2², with 11 trials, with three central points using three different enzymes: Alcalase, Viscozyme and Protex 51FP. The optimization of enzymatic hydrolysis was performed by the Response Surface methodology in order to obtain higher values of degree of hydrolysis and protein recovery. After being made the hydrolysis tests were submitted to determine the degree of hydrolysis (% DH) by TNBS (trinitrobenzenesulfonic) and the yield of protein recovery. The responses of the contour curves showed that the hydrolysis made with Alcalase showed the highest GH% yield and recovery of protein in the conditions of pH 8.0 and enzyme concentration of 2.0% (w / w). For the best Viscozyme enzyme hydrolytic activity was obtained at pH 4.4 and enzyme concentration in the range of around 2.0% (w / w). The enzyme Protex 51FP performed better at pH 8.0 and enzyme concentration of 2.0% (w / w). . The degree of hydrolysis and protein recovery was: 45.05 and 63.95%, 26.81% and 52.87%, 74.8% and 89.48% for the enzymes Alcalase, Viscozyme and Protex 51FP, respectively. Even after eight hours of the hydrolysis reaction breaks continued to occur with all enzymes must have been an additional action of endogenous enzymes that were released from the cells after the disruption of the cell wall.

Key words: Hydrolyzed yeast, enzymatic hydrolysis, yeast, hydrolysis degree

INTRODUÇÃO

As leveduras, microorganismos provenientes da fermentação do álcool nas destilarias apresentam-se como fonte de proteína, aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais (SANTOS et al., 2009). Nas indústrias sucroalcooleiras, devido à rápida velocidade de crescimento destes microorganismos, ocorre sempre excesso de produção de levedura que pode ser usada em diversos fins. Por ano, só as destilarias brasileiras produzem cerca de 500 mil toneladas de levedura, sendo que o rendimento de levedura por metro cúbico de álcool produzido pode chegar até 20 kg (SALGADO e SARRUGE, 2006). Atualmente, com o incentivo à produção de energias alternativas, a produção de álcool e o volume de levedura gerado têm crescido exponencialmente. Na alimentação humana as leveduras são utilizadas desde a antiguidade, sendo consideradas fontes de nutrientes, principalmente de natureza protéica, uma vez que apresenta em torno de 40 a 70% de proteína (SGARBIERI, 1996). Hoje em dia sua

utilização na alimentação humana é mais voltada para a forma de complemento nutricional, aromatizante e realçador de sabor (YAMADA *et al.*, 2003).

Devido ao elevado valor dos suplementos alimentares, utilizados como fonte protéica de valor nutricional elevado, formas inovadoras estão sendo procuradas para que este mercado mantenha sempre novidades e produtos atrativos com altas porcentagens de proteínas (FERNANDES *et al.*, 1998). Desta forma, o presente estudo teve por finalidade o desenvolvimento hidrolisados de levedura para posterior aplicação na nutrição humana como suplemento alimentar.

MATERIAIS E MÉTODOS

Matéria-prima: foi utilizada levedura da produção de etanol (*Saccharomyces cerevisiae*) gentilmente cedida pela Usina (sucroalcooleira) Santa Adélia localizada na cidade de Jaboticabal – SP. As enzimas utilizadas foram: Alcalase (Novozymes), Viscozyme e Protex 51FP (ambas cedidas pela Genencor/Danisco).

Métodos: a composição centesimal foi determinada de acordo com a AOAC (2005).

Planejamento Experimental para a biomassa de levedura: a obtenção dos hidrolisados foi realizada a partir de um planejamento experimental 2^2 , com 11 ensaios, sendo 3 pontos centrais. As variáveis independentes foram pH e concentração de enzima, sendo a temperatura constante em todos os tratamentos. As variáveis dependentes foram porcentagem de grau de hidrólise e porcentagem de recuperação de proteína. Através dos planejamentos experimentais foi possível estudar os efeitos das variáveis independentes sobre as respostas das variáveis dependentes. Os experimentos de hidrólise foram realizados em Banho-Maria Dubnoff (Tecnal) em temperatura específica para cada enzima (Alcalase: $60 \pm 1^\circ\text{C}$; Viscozyme: $51 \pm 1^\circ\text{C}$; Protex 51 FP: $50 \pm 1^\circ\text{C}$), com agitação constante, durante 8 horas. Utilizou-se uma concentração de substrato de 10% (p/v). O pH foi controlado através da adição de solução tampão, determinada para cada ensaio. Os ensaios experimentais foram conduzidos em pH variando de 3,5 a 8,5 e concentração de enzima de 0,8 a 2% (g enzima/100g amostra para Protex 51 FP e mL enzima/100g amostra para Alcalase e Viscozyme), conforme o planejamento experimental definido para cada enzima.

Em todos os ensaios foram realizados a determinação do grau de hidrólise (%GH) por ácido Trinitrobenzenosulfônico (TNBS), proposto por Adler-Niessen (1979), e porcentagem de rendimento da recuperação de proteína que é obtido após a determinação do teor de proteína solúvel no sobrenadante do hidrolisado centrifugado, utilizando-se a fórmula:

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{\% \text{ PTN Final}}{\% \text{ PTN Inicial}} \times 100$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição centesimal da levedura utilizada no projeto (Figura 1) foi determinada a partir dos resultados apresentados na TABELA 1.

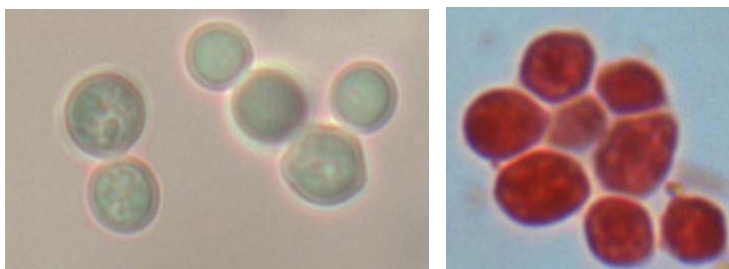


FIGURA 1 - células de *S. cerevisiae* em microscopia óptica com e sem coloração de gram.

TABELA 1 - Composição centesimal das células íntegras de leveduras utilizadas no projeto.

| Determinações | Levedura |
|------------------|------------------|
| Proteína (%) | 33,45 \pm 0,06 |
| Lipídeos (%) | 1,87 \pm 0,05 |
| Cinzas (%) | 4,01 \pm 0,03 |
| Umidade (%) | 7,72 \pm 0,13 |
| Ferro (mg/100g) | 11,8 \pm 0,6 |
| Carboidratos (%) | 60,67 |
| VC* (kcal/100g) | 393,31 |

*VC= Valor calórico

O valor baixo de proteína encontrados na TABELA 1, inferior ao descrito na literatura, pode ser justificado pelo processo de utilização intensiva que estas leveduras sofreram nas usinas. Quanto mais reutilizada a levedura no processo de fermentação da cana-de-açúcar, menor é seu teor de proteína, pois a célula encontra-se mais esgotada quanto ao conteúdo de nutrientes. Quando comparadas às leveduras provenientes de usinas de álcool com a de cervejaria, as de destilaria de álcool apresentaram teores mais baixos de proteína e de lipídios totais, coincidindo com estudos já realizados (CABALLERO-CÓRDOBA e SGARBIERI, 2000).

Quanto à % do grau de hidrólise (GH) a FIGURA 2 apresenta um gráfico comparativo dos resultados obtidos para as três enzimas utilizadas, nas diferentes condições do ensaio. A FIGURA 3 apresenta o gráfico comparativo da porcentagem de rendimento da recuperação da PTN, nos diferentes testes.

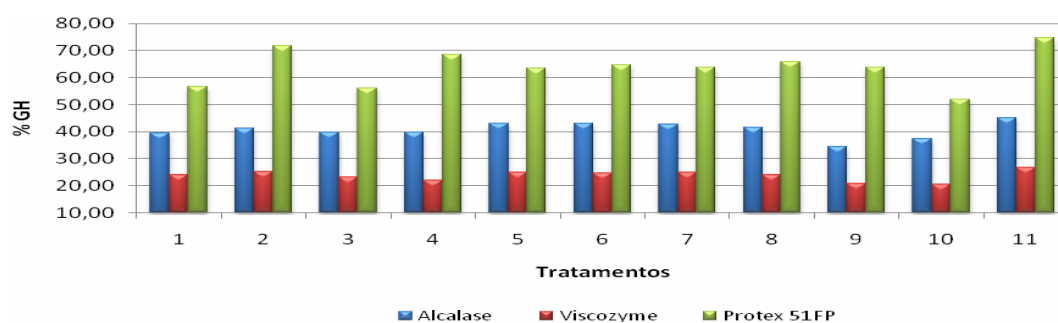


FIGURA 2 - %GH da proteína de levedura por diferentes enzimas e condições de ensaio.

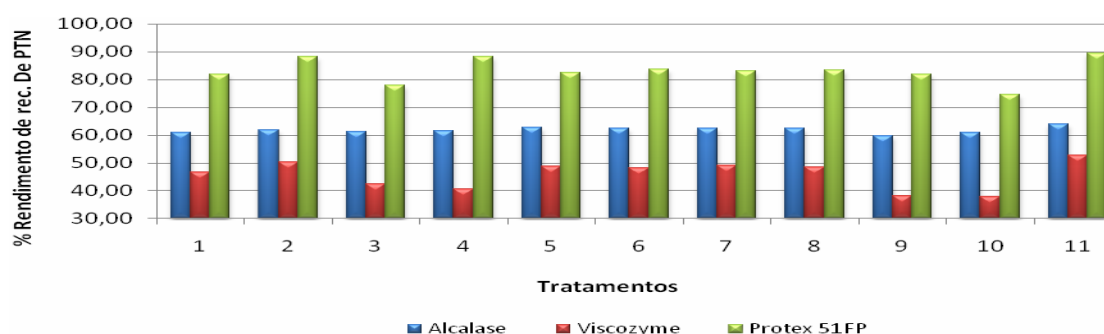


FIGURA 3 - Rendimento de recuperação da proteína de levedura por diferentes enzimas e condições de ensaio.

Observa-se que ambos os gráficos (FIGURA 2 e 3) obtiveram uma correlação positiva entre os resultados destes dois parâmetros avaliados. Porém a enzima Protex 51FP foi a que apresentou melhores resultados tanto na %GH quanto na % de rendimento da recuperação da PTN, provavelmente por ser um complexo enzimático misto, contendo endo e exo proteases em sua composição.

CONCLUSÃO

- O teor de proteína da levedura das células foi inferior ao reportado pela literatura, provavelmente devido ao tempo de utilização das mesmas;
- Para a biomassa de levedura hidrolisada pela enzima Alcalase os melhores valores de rendimento de recuperação de proteína foram obtidos para valores de pH 8,0 e concentração da enzima de 2,0 % (p/p), para a Viscozyme foram para valores de pH 4,4 e concentração da enzima de 2,0% (p/p) e para a Protex 51FP valores pH de 8,0 e concentração da enzima de 2,0% (p/p),
- a enzima Protex 51FP apresentou o maior %GH e % rendimento na recuperação das proteínas, sendo de 74,8% e 89,48%, respectivamente.

REFERÊNCIAS

ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 27, n. 6, p. 1256-1262, 1979.

A.O.A.C. HORWITZ, W. (Ed.) **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18th ed., Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2005.

CABALLERO-CÓRDOBA, G. M.; SGARBIERI V. C. Nutritional and toxicological evaluation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) biomass and a yeast protein concentrate. **Journal of Science Food Agriculture**. v. 80, p. 341-51, 2000.

FERNANDES, E. A. N., NEPOMUCENO, N., TREVIZAM, A. B. & AMORIM H. V. From potential to reality: Yeast derived from ethanol production for animal nutrition. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 234, n. 1-2, p. 113-118, 1998.

SALGADO, J. M.; SARRUGE, J. R. Efeito da lavagem sobre a qualidade do concentrado protéico obtido em destilaria de álcool. **Revista Brasileira Tecnológica**, p. 339-344, 2006.

SANTOS, G. D. Perspectivas Brasileira e Mundial da Produção de Levedura. In: **Anais do 1º Congresso Internacional sobre Uso da Levedura na Alimentação Animal**. Colégio Brasileiro de Nutrição Animal – CBNA. Campinas/SP, p. 202, 2009.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Varela, p.517, 1996.

TURNER, L. Monterrey workshop summary: evaluating the usefulness of elemental iron powders. **Nutrition Reviews**, v. 60, n.7 p. S16-S17, 2002.

YAMADA, E. A.; ALVIM, I. D.; SANTUCCI, M. C. C.; SGARBIERI, V. C. Composição cetesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 4, p. 423-432, 2003.